

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-52145
(P2006-52145A)

(43) 公開日 平成18年2月23日(2006.2.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 36/18 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 C	4 C 0 8 8
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 11 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-232778 (P2004-232778)	(71) 出願人	398050777 株式会社アルソア本社 山梨県北巨摩郡小淵沢町2961番地
(22) 出願日	平成16年8月9日(2004.8.9)	(74) 代理人	100104709 弁理士 松尾 誠剛
		(74) 代理人	100106404 弁理士 江森 健二
		(72) 発明者	高木 紀子 山梨県北巨摩郡小淵沢町2961番地 株式会社アルソア本社内
		(72) 発明者	松嶋 宏典 山梨県北巨摩郡小淵沢町2961番地 株式会社アルソア本社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 TNF- α 阻害剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 優れたTNF- α 阻害作用および高い安全性を有するTNF- α 阻害剤を提供する。

【解決手段】 白鶴霊芝の水および/または有機溶媒抽出物を主成分とすることを特徴とするTNF- α 阻害剤。

【効果】 本発明のTNF- α 阻害剤は、優れたTNF- α 阻害作用を示すため、TNF- α の過剰な産生が引き起こす組織障害やさまざまな病気(例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)、悪液質、急性感染症、アレルギー、発熱、貧血、糖尿病、破骨細胞形成、緑内障など。)や疼痛の治療および予防効果が期待できる。さらに本発明のTNF- α 阻害剤は、高い安全性を有するため、長期連用しても人体に有害な作用を及ぼさない利益がある。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

白鶴霊芝の水および/または有機溶媒抽出物を主成分とすることを特徴とする T N F - 阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は T N F - 阻害剤に関する。

【背景技術】

【0002】

T N F - (Tumor Necrosis Factor- : 腫瘍壊死因子) は、炎症を通じた生体防御・免疫機構に広く関わるサイトカインとして認識されている(例えば、特許文献 1 参照。)。そして、T N F - の過剰な産生が組織障害やさまざまな病気(例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(S L E)、悪液質、急性感染症、アレルギー、発熱、貧血、糖尿病など。)を引き起こす原因となることが知られている(例えば、非特許文献 1 参照。)。また、T N F - が自己免疫性疾患である慢性関節リウマチおよびクローン病の発症に重要な役割を果たしていることも知られている(例えば、非特許文献 2 参照。)。

【0003】

このようなことから、T N F - 阻害剤は、上記した疾患の治療に有効であると期待され、様々な化合物(例えば、6 - フェニルテトラヒドロ - 1 , 3 - オキサジン - 2 - オン誘導体、側鎖に硫黄原子を有するウレア誘導体、ベンゾヘテロ環化合物、1 , 3 - チアゾール化合物、メタロプロテアーゼ阻害剤、シクロスポリン A など。)についての T N F - 阻害活性が研究されている(例えば、非特許文献 1 および 2 ならびに特許文献 1 ~ 7 参照。)。

なお、T N F - 阻害剤は、疼痛に対しても優れた予防・治療効果を発揮し、また、破骨細胞の活性化を抑制し、破骨細胞の形成を阻害することも知られている(例えば、特許文献 6 参照。)。また、T N F - 阻害剤は、緑内障の治療にも使用できることが知られている(例えば、特許文献 7 参照。)。

【0004】

白鶴霊芝(Rhinacanthus nasuta(L.) Kurz) は、インド南部デカン高原の原産とされるリナカンサス属きつねのまご科に属する常緑小低木であり、その全草(リナカンツス草)は駆虫、消炎、皮膚真菌に対する抗菌作用のあることが知られ(例えば、非特許文献 3 参照。)、主に中国、台湾等において、また最近では日本国においても漢方薬として用いられている。その他、本出願人による以前の出願で、白鶴霊芝に活性酸素消去能があること(特許文献 8 参照。)、排泄促進作用があること(特許文献 9 参照。)、抗アレルギー作用があること(特許文献 10 参照。)および抗悪性腫瘍作用があること(特許文献 11 参照。)が開示されている。しかしながら、この白鶴霊芝乃至白鶴霊芝の水および/または有機溶媒抽出物に T N F - 阻害作用があることは知られていない。

【0005】

【特許文献 1】特開 2002 - 53555 号

【特許文献 2】特開 2003 - 300884 号

【特許文献 3】特開 2000 - 44533 号

【特許文献 4】特開 2000 - 119249 号

【特許文献 5】特開平 8 - 73453 号

【特許文献 6】特開 2003 - 63993 号

【特許文献 7】特表平 9 - 508115 号

【特許文献 8】特開平 9 - 143091 号

【特許文献 9】特開平 9 - 169662 号

【特許文献 10】特開 2001 - 10964 号

【特許文献 11】特開 2002 - 53481 号

10

20

30

40

50

【非特許文献1】山崎、臨床免疫、27および1270、1995

【非特許文献2】Andreas Eigler et al., Immunology Today, 18, 487, 1997

【非特許文献3】原色牧野和漢薬草大図鑑、492頁、北隆館、1988年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者等は、TNF- 阻害作用を有する物質につき鋭意研究の結果、従来漢方薬などとして使用されている白鶴霊芝の水および/または有機溶媒抽出物が有効であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、白鶴霊芝の水および/または有機溶媒抽出物を主成分とすることを特徴とするTNF- 阻害剤である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

以下、本発明のTNF- 阻害剤を、発明を実施するための最良の形態に基づいてさらに詳細に説明する。

【0009】

本発明のTNF- 阻害剤に使用する白鶴霊芝は、市販されている葉、全草、根もしくは茎、またはこれらの混合物を使用することができる。これらを天日乾燥および/またはドラム乾燥し、粉碎機にかけて12メッシュ以上に粉碎して使用することも好ましい。白鶴霊芝は、必要により、天日乾燥および/またはドラム乾燥したものをさらに焙煎器により焙煎したものをすることもできる。

【0010】

本発明のTNF- 阻害剤は、このようにして得られた白鶴霊芝を水および/または有機溶媒で抽出して製造される。

【0011】

抽出に使用する溶媒としては、水および有機溶媒が挙げられ、これらを単独でまたは2種以上を混合して使用することができる。水には冷却水、常温水および熱水が包含される。

【0012】

抽出に使用する有機溶媒としては、エタノール、メタノール、プロパノール、1,3-ブチレングリコール等のアルコール類、ジメチルエーテル、ジエチルエーテル、メチルエチルエーテル等のエーテル類、アセトン等のケトン類、ベンゼン等のフェノール類、ヘキササン、ヘプタン、流動パラフィン、スクワラン等の炭化水素類等が挙げられるが、エタノールおよびメタノールが特に好ましい。

【0013】

抽出は、粉碎した白鶴霊芝に5倍量から50倍量の水または有機溶媒を加えて、放置、振とう、攪拌または還流しつつ行う。抽出は、0 から130 の温度で行うことができるが、室温から110 の温度で行うことが好ましい。抽出に要する時間は、抽出温度および白鶴霊芝の粉碎状態にもよるが、通常30分から6時間程度である。

【0014】

抽出後、デカンテーション、遠心分離、減圧濾過等の慣用手段を用いて、無臭乃至僅かな芳香、独特のコクのある味を帯びた透明で緑褐色乃至黒褐色の液体が得られる。これをそのまままたはさらに濾過、遠沈、その他の方法で精製したものを本発明のTNF- 阻害剤として使用することができる。

また、これを適度に濃縮して得られる濃縮液を本発明のTNF- 阻害剤として使用することもできる。

また、この濃縮液をさらに凍結乾燥、減圧濃縮乾固、スプレードライ、蒸留乾固等の乾燥手段で処理して得られる微粉末を本発明のTNF- 阻害剤として使用することもでき

10

20

30

40

50

る。

【0015】

本発明のTNF-阻害剤においては、上記した白鶴霊芝の水および/または有機溶媒抽出物に加えて、必要に応じて、本発明の効果を損なわない範囲で、食品、医薬部外品、医薬品等に一般に用いられる各種成分、すなわち水性成分、粉末成分、油分、界面活性剤、保湿剤、増粘剤、酸化防止剤、香料、色素等を配合することもできる。これにより、本発明のTNF-阻害剤は、食品、医薬部外品、医薬品等の広範な用途に用いることができるようになる。

【実施例】

【0016】

10

実施例 1

天日乾燥し、次いでドラム乾燥した白鶴霊芝の根を粉碎機にて粉碎し、得られた粉碎物を篩にかけて12メッシュで分級して白鶴霊芝根粉碎物を得た。この白鶴霊芝根粉碎物1kgを90%エタノール10Lで3時間還流下に2回抽出し、得られた抽出液を55~60で減圧下に約10分の1量に濃縮後、加圧濾過した。濾液を90~95で加熱滅菌後、減圧下に濃縮乾固し、微粉末状の白鶴霊芝根90%エタノール抽出物85.5gを得た。

【0017】

実施例 2

天日乾燥し、次いでドラム乾燥した白鶴霊芝の葉を粉碎機にて粉碎し、焙煎器にて焙煎後、さらに粉碎し、得られた粉碎物を篩にかけて12メッシュで分級して白鶴霊芝葉粉碎物を得た。この白鶴霊芝葉粉碎物1kgを90の熱水25Lで2時間、2回抽出し、得られた抽出液を55~60で減圧下に約10分の1量に濃縮後、加圧濾過した。濾液を90~95で加熱滅菌後、減圧下に濃縮乾固し、微粉末状の白鶴霊芝葉熱水抽出物310gを得た。

20

【0018】

実施例 3

天日乾燥し、次いでドラム乾燥した白鶴霊芝の全草を粉碎機にて粉碎し、得られた粉碎物を篩にかけて12メッシュで分級して白鶴霊芝全草粉碎物を得た。この白鶴霊芝全草粉碎物1kgを90の熱水25Lで2時間、2回抽出し、得られた抽出液を55~60で減圧下に約10分の1量に濃縮後、加圧濾過した。濾液を90~95で加熱滅菌後、減圧下に濃縮乾固し、微粉末状の白鶴霊芝全草熱水抽出物180gを得た。

30

【0019】

実施例 4

実施例1と同様にして得られた白鶴霊芝根粉碎物2.5gを90%エタノール100mlに浸漬、濾過して、僅かな芳香、独特のコクのある味を帯びた黒褐色の液状の白鶴霊芝根90%エタノール抽出物を得た。

【0020】

実施例 5

実施例2と同様にして得られた白鶴霊芝葉粉碎物2.5gを90の熱水100mlに浸漬、濾過して、僅かな芳香、独特のコクのある味を帯びた緑褐色の液状の白鶴霊芝葉熱水抽出物を得た。

40

【0021】

実施例 6

実施例3と同様にして得られた白鶴霊芝全草粉碎物2.5gを90の熱水100mlに浸漬、濾過して、僅かな芳香、独特のコクのある味を帯びた深い緑色の液状の白鶴霊芝全草熱水抽出物を得た。

【0022】

試験例 1

実施例1で得られた微粉末状の白鶴霊芝根90%エタノール抽出物を用いてTNF-

50

阻害作用および毒性を評価した。

【0023】

A. TNF - 阻害作用の評価

1. 肥満細胞の刺激

(1) 抗原およびIgEを用いた肥満細胞の刺激

ラットの肥満細胞 (RBL-2H3 (JCRB Cell Bank (細胞番号: JCRB0023))) (1×10^6 cells/ml) を、マウス抗DNP特異的IgEモノクローナル抗体にて18時間感作した。次に、遠心分離後、Tyrode'sバッファー (0.04%のBSAおよび10mMのHEPESを含む。) により複数回洗浄した。次に、この細胞を96ウェルプレートに入れ、表1に示す量のDNP-HSA (human serum albumin) および微粉末状の白鶴霊芝根90%エタノール抽出物を含む溶液を加えて24時間刺激した。

【0024】

【表1】

試料No.	DNP-HSA (ng/ml)	白鶴霊芝根90%エタノール抽出物 (μ g/ml)
1	0	0
2	100	0
3	100	50
4	100	100
5	100	250
6	100	500

20

【0025】

(2) イオノマイシンを用いた肥満細胞の刺激

ラットの肥満細胞 (RBL-2H3 (1×10^6 cells/ml)) を96ウェルプレートに入れ、表2に示す量のイオノマイシンおよび微粉末状の白鶴霊芝根90%エタノール抽出物を加えて24時間刺激した。

【0026】

【表2】

試料No.	イオノマイシン (μ M)	白鶴霊芝根90%エタノール抽出物 (μ g/ml)
1	0	0
2	1	0
3	1	50
4	1	100
5	1	250
6	1	500

40

【0027】

2. TNF - 阻害作用

(1) TNF - 阻害作用の評価方法

TNF - 阻害作用の評価は、上記1.の(1)および(2)のそれぞれについて、24時間の刺激の後、上記した各96ウェルプレートを遠心分離にかけ、上清を回収し、上

50

清中のTNF- α の濃度をサンドイッチELISA法により測定することにより行った。サンドイッチELISA法による測定は、米国R&Dシステムズ社(R&D Systems Inc.)のキットを用いて、付属のプロトコルに従って行った。その概要は以下の通りである。

【0028】

まず、あらかじめTNF- α に対するポリクローナル抗体でコートされたキット付属の96ウェルマイクロプレートの各ウェルに、回収した上清を50 μ l加え、室温で2時間反応させた。

次に、各ウェルの中の液体を除去し、キット付属の洗浄液により各ウェルを5回洗浄した後、キット付属の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)が付加された、TNF- α に対するモノクローナル抗体を含む液を各ウェルに100 μ l加え、室温で2時間反応させた。

10

【0029】

次に、各ウェルの中の液体を除去し、キット付属の洗浄液により各ウェルを洗浄した後、キット付属の発色液を加えて室温で30分間反応させ、その後、キット付属の反応停止液(hydrochloric acid)を加えて反応を停止させた。

得られた試料について、マイクロプレートリーダー(米国モレキュラーデバイス社(Molecular Device Corporation)製)を用いて、450nm(参照波長は540nm。)における吸光度を測定し、標準曲線からTNF- α の濃度を算出した。

【0030】

(2) 評価結果

評価結果を図1および図2に示す。図1は、上記1.(1)(抗原およびIgEを用いて肥満細胞を刺激した場合)における、肥満細胞からのTNF- α の放出量と白鶴霊芝根90%エタノール抽出物の添加量との関係を示す図である。図2は、上記1.(2)(イオノマイシンを用いて肥満細胞を刺激した場合)における、肥満細胞からのTNF- α の放出量と白鶴霊芝根90%エタノール抽出物の添加量との関係を示す図である。

20

【0031】

図1および図2に示すように、実施例1における白鶴霊芝根90%エタノール抽出物は、優れたTNF- α 阻害作用を有することがわかった。

【0032】

3. 免疫抑制剤シクロスポリンAとの比較

白鶴霊芝根90%エタノール抽出物のTNF- α 阻害作用と、免疫抑制剤シクロスポリンAのTNF- α 阻害作用との比較を行った。比較は、表3に示す量のDNP-HSA(human serum albumin)を用いた場合について行った。

30

【0033】

【表3】

試料No.	DNP-HSA (ng/ml)	TNF- α 阻害剤
1	100	なし
2	100	白鶴霊芝根90%エタノール抽出物 (500 μ g/ml)
3	100	シクロスポリンA (100ng/ml)

40

【0034】

図3は、白鶴霊芝のTNF- α 阻害作用と免疫抑制剤シクロスポリンAのTNF- α 阻害作用との関係を示す図である。

50

図3に示すように、実施例1における白鶴霊芝根90%エタノール抽出物は、免疫抑制剤シクロスポリンAと同様に優れたTNF-阻害作用を有することがわかった。

【0035】

B. 毒性の評価

毒性の評価は、ラットの肥満細胞(RBL-2H3)に表4に示す濃度の白鶴霊芝根90%エタノール抽出物を添加して24時間の培養を行った後、MTS試薬を加えさらに2時間の培養を行い、その後、マイクロプレートリーダー(テカン ジャパン社製)を用いて490nmの吸光度を測定することにより行った。

【0036】

【表4】

10

試料No.	白鶴霊芝根90%エタノール抽出物 ($\mu\text{g/ml}$)
1	0
2	50
3	100
4	250
5	500

20

【0037】

その結果、試料No.1乃至試料No.5におけるMTS結果から、白鶴霊芝根90%エタノール抽出物は、肥満細胞に対する毒性が極めて低いことがわかった。

【0038】

C. 試験例1のまとめ

以上より、白鶴霊芝根90%エタノール抽出物は、優れたTNF-阻害作用および高い安全性を有する、優れたTNF-阻害剤であることがわかった。

【0039】

試験例2

実施例1で得られた白鶴霊芝根90%エタノール抽出物に代えて、実施例2で得られた白鶴霊芝葉熱水抽出物を用いたこと以外は、試験例1と同様にして、TNF-阻害作用および毒性を評価した。

その結果、実施例2で得られた白鶴霊芝葉熱水抽出物は、実施例1の場合と同様に、優れたTNF-阻害作用および高い安全性を有することがわかった。

【0040】

試験例3

実施例1で得られた白鶴霊芝根90%エタノール抽出物に代えて、実施例3で得られた白鶴霊芝全草熱水抽出物を用いたこと以外は、試験例1と同様にして、TNF-阻害作用および毒性を評価した。

その結果、実施例3で得られた白鶴霊芝全草熱水抽出物は、実施例1の場合と同様に、優れたTNF-阻害作用および高い安全性を有することがわかった。

【0041】

試験例4

実施例1で得られた白鶴霊芝根90%エタノール抽出物に代えて、実施例4で得られた白鶴霊芝根90%エタノール抽出液を用いたこと以外は、試験例1と同様にして、TNF-阻害作用および毒性を評価した。

その結果、実施例4で得られた白鶴霊芝根90%エタノール抽出液は、実施例1の場合と同様に、優れたTNF-阻害作用および高い安全性を有することがわかった。

【0042】

30

40

50

試験例 5

実施例 1 で得られた白鶴霊芝根 90% エタノール抽出物に代えて、実施例 5 で得られた白鶴霊芝葉熱水抽出液を用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして、TNF- α 阻害作用および毒性を評価した。

その結果、実施例 5 で得られた白鶴霊芝葉熱水抽出液は、実施例 1 の場合と同様に、優れた TNF- α 阻害作用および高い安全性を有することがわかった。

【0043】

試験例 6

実施例 1 で得られた白鶴霊芝根 90% エタノール抽出物に代えて、実施例 6 で得られた白鶴霊芝全草熱水抽出液を用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして、TNF- α 阻害作用を評価した。

その結果、実施例 6 で得られた白鶴霊芝全草熱水抽出液は、実施例 1 の場合と同様に、優れた TNF- α 阻害作用および高い安全性を有することがわかった。

【0044】

以上説明したように、本発明の TNF- α 阻害剤は、優れた TNF- α 阻害作用を有するため、TNF- α の過剰な産生が引き起こす組織障害やさまざまな病気（例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）、悪液質、急性感染症、アレルギー、発熱、貧血、糖尿病など。）の治療および予防効果が期待できる。また、本発明の TNF- α 阻害剤は、高い安全性を有するため、長期連用しても人体に有害な作用を及ぼさない利益がある。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図 1】抗原および IgE を用いて肥満細胞を刺激した場合の、肥満細胞からの TNF- α 放出量と白鶴霊芝根 90% エタノール抽出物に含まれる白鶴霊芝濃度との関係を示す図である。

【図 2】イオノマイシンを用いて肥満細胞を刺激した場合の、肥満細胞からの TNF- α 放出量と白鶴霊芝根 90% エタノール抽出物に含まれる白鶴霊芝濃度との関係を示す図である。

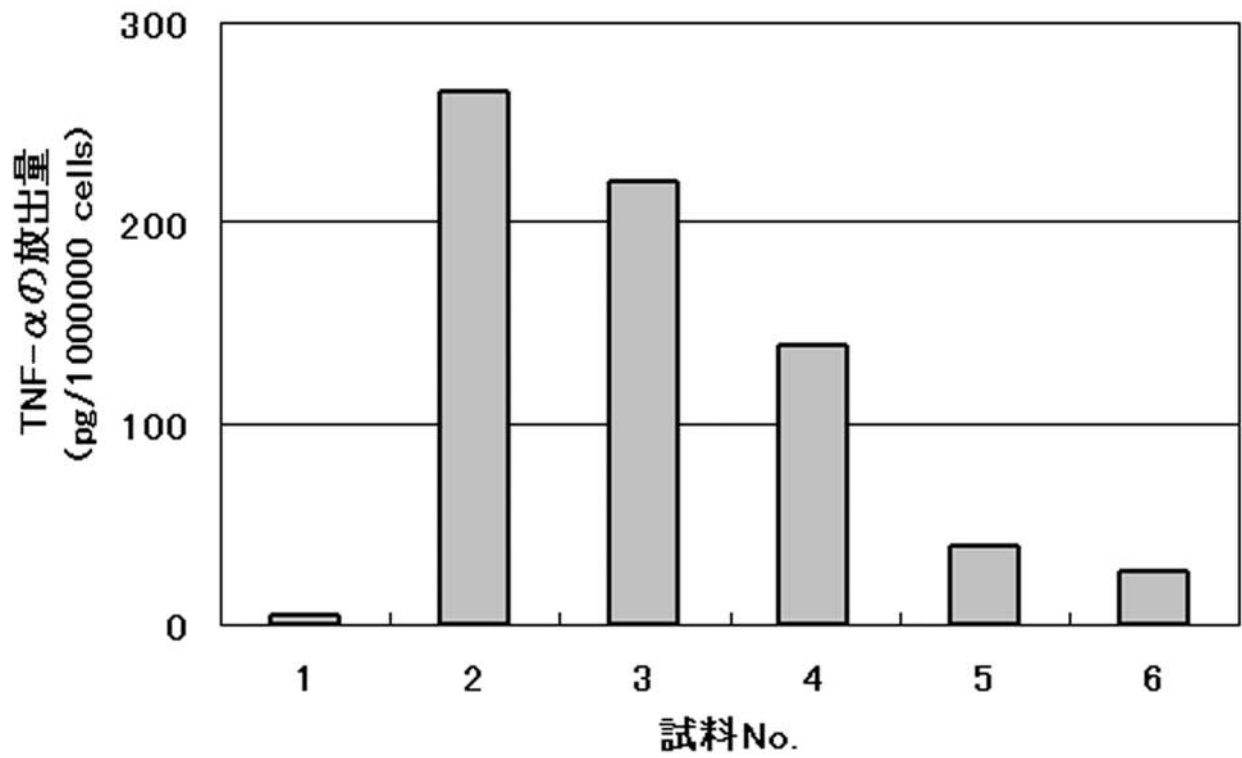
【図 3】抗原および IgE を用いて肥満細胞を刺激した場合の、白鶴霊芝の TNF- α 阻害作用と免疫抑制剤シクロスポリンの TNF- α 阻害作用との関係を示す図である。

10

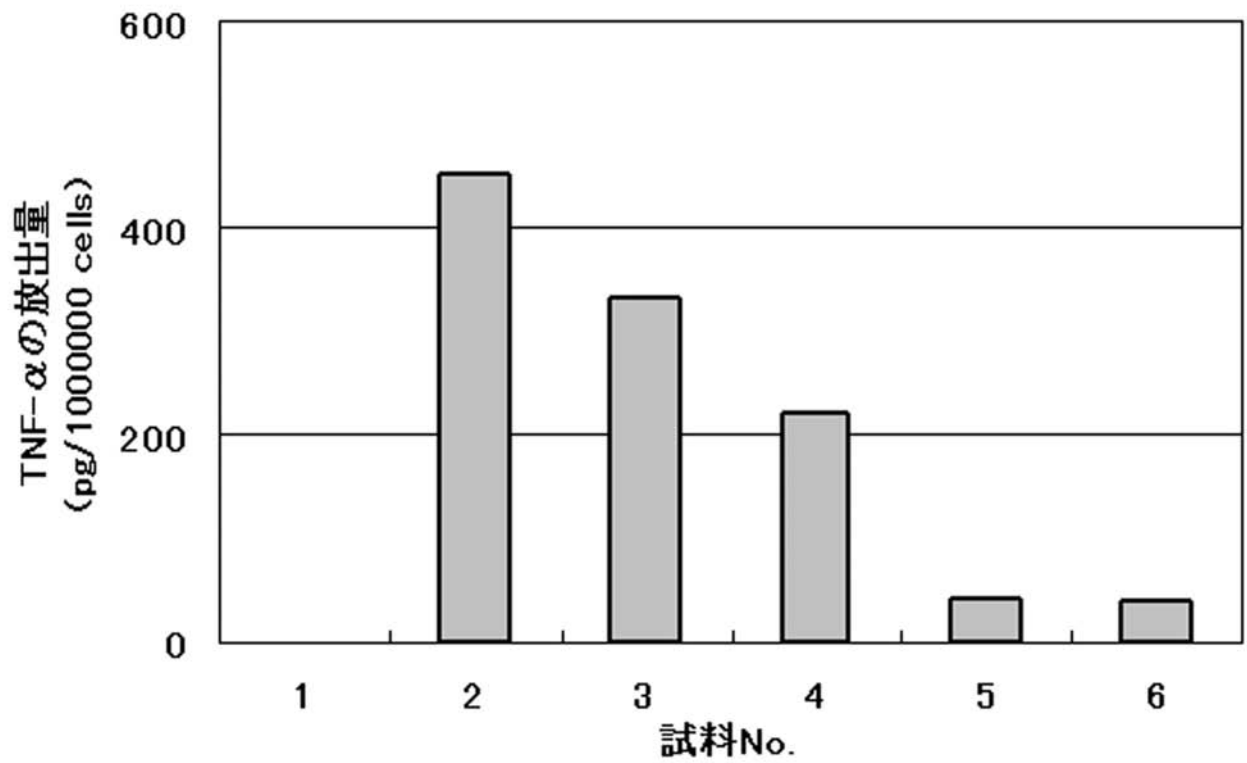
20

30

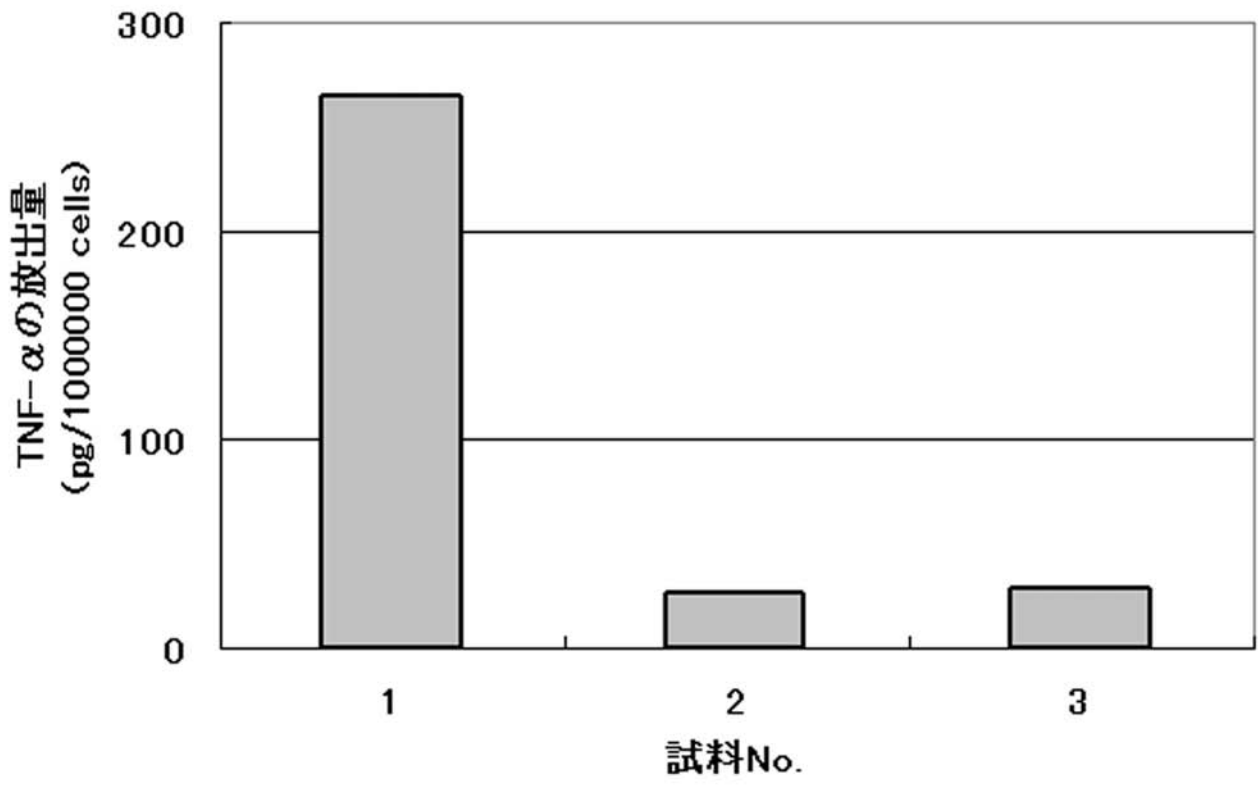
【図1】



【図2】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

F ターム(参考) 4C088 AB12 AC05 AC11 BA08 BA37 CA05 CA06 CA07 CA08 CA09
CA11 CA17 NA14 ZA33 ZA51 ZA55 ZA66 ZA96 ZB07 ZB11
ZB13 ZB15 ZB32 ZC35 ZC41